

PCT/JP2004/004184

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

25. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 1 8 1 9
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 1 8 1 9]

出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所
Applicant(s): 興和株式会社

REC'D 21 MAY 2004

WIPO

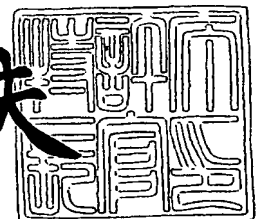
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 6 7 6 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 187409

【提出日】 平成15年 3月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/31
C07K 14/195
A61K ABA
A61K 38/16
A61K 39/085

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

【氏名】 中島 敏博

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

【氏名】 佐々木 巧

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

【氏名】 来海 和彦

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

【氏名】 桑田 茂喜

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

【氏名】 西原 司

【発明者】**【住所又は居所】** 熊本県熊本市四方寄町 1 6 0 4**【氏名】** 坂田 敦子**【発明者】****【住所又は居所】** 埼玉県所沢市中新井 3 - 9 - 5**【氏名】** 大口 正夫**【発明者】****【住所又は居所】** 埼玉県志木市館 2 - 4 - 4 - 2 0 6**【氏名】** 古志 朋之**【発明者】****【住所又は居所】** 埼玉県川越市仙波町 1 - 3 - 1 5**【氏名】** 枝野 敏行**【特許出願人】****【識別番号】** 000173555**【住所又は居所】** 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号**【氏名又は名称】** 財団法人化学及血清療法研究所**【特許出願人】****【識別番号】** 000163006**【住所又は居所】** 愛知県名古屋市中区錦三丁目 6 番 2 9 号**【氏名又は名称】** 興和株式會社**【代理人】****【識別番号】** 100062144**【弁理士】****【氏名又は名称】** 青山 葆**【選任した代理人】****【識別番号】** 100086405**【弁理士】****【氏名又は名称】** 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100068526

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9807880

【包括委任状番号】 0012774

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 SEB 改変体およびそれを含有する免疫異常性疾患の予防・治療用剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 黄色ブドウ球菌腸管内毒素 B (SEB) に対する中和抗体 (抗 SEB 抗体) との反応性を低減させた SEB 改変体。

【請求項 2】 SEB のアミノ酸配列に任意のアミノ酸置換を導入することにより抗 SEB 抗体との反応性を低減させた、請求項 1 に記載の SEB 改変体。

【請求項 3】 SEB のアミノ酸配列中の抗 SEB 抗体エピトープ認識部位にアミノ酸置換を導入する、請求項 2 に記載の SEB 改変体。

【請求項 4】 SEB のアミノ酸配列中の 226 位の L y s から 229 位の L y s までの領域でアミノ酸置換を導入した、請求項 2 または 3 に記載の SEB 改変体。

【請求項 5】 SEB のアミノ酸配列中の 226 位から 229 位までのアミノ酸配列が L e u P h e A l a A l a である、請求項 4 に記載の SEB 改変体。

【請求項 6】 SEB のアミノ酸配列中の 226 位から 229 位までのアミノ酸配列が A l a T h r T h r G l n である、請求項 4 に記載の SEB 改変体。

【請求項 7】 SEB のアミノ酸配列中の 226 位から 229 位までのアミノ酸配列が L y s A r g I l e I l e である、請求項 4 に記載の SEB 改変体。

【請求項 8】 SEB のアミノ酸配列中の 23 位の A s n が T y r で置換されている、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の SEB 改変体。

【請求項 9】 請求項 1 から 8 のいずれかに記載の SEB 改変体を主成分として含有し、SEB に対する免疫学的応答性を低下させ、T 細胞活性化の抑制作用を有するものであることを特徴とする、免疫異常性疾患の予防・治療用剤。

【請求項 10】 免疫異常性疾患が関節リウマチである、請求項 9 に記載の免疫異常性疾患の予防・治療用剤。

【請求項 11】 経口投与剤である、請求項 9 または 10 に記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、新規な免疫異常性疾患の予防・治療用剤に関する。更に詳細には、細菌性スーパー抗原の一つとして知られる黄色ブドウ球菌腸管内毒素B (Staphylococcal enterotoxin B; 以下、「SEB」と呼称する) の改変体および該改変体を有効成分として含有する関節リウマチ、アレルギー性疾患等の免疫異常性疾患の予防・治療用剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

自己免疫疾患は、関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; 以下、「RA」と呼称することがある) 等の臓器非特異的自己免疫疾患と潰瘍性大腸炎等の臓器特異的自己免疫疾患とに大きく分けられるが、通常は免疫学的寛容の状態にある自己の抗原に対して応答するT細胞が、何らかの原因で自己の組織内で活性化され自己抗原と応答するようになり、これが持続的な炎症反応となって組織に障害を与えることに起因するものである。その場合の自己抗原とは、それぞれ自己の関節の成分であるII型コラーゲンや消化管粘膜の主成分である。

【0003】

これらの疾患の患者数は毎年、僅かながら増加しているにもかかわらず、今なお有効な治療薬や予防方法は見出されていない (非特許文献1)。現在これらの疾患の治療には、サラゾピリン、5-アミノサリチル酸、アザチオプリン、6-MP、トラニラスト、メトトレキセート、シクロスポリンA、メタロダニゾールの投与およびγS-免疫グロブリンの大量投与等の薬物療法や胸腺摘出術、人工関節への置換術等の外科的療法、更には栄養療法等の対症療法が行われている (非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7)。しかしながら、これらは根治的な療法とはいえず、むしろ長期服用によるため重篤な副作用の原因ともなり、より有効な予防・治療薬、治療法の開発が望まれている。

【0004】

SEBは黄色ブドウ球菌によって産生されるエンテロトキシン (腸管毒; 毒素

型食中毒の原因毒素)の1種である。SEBは239個のアミノ酸残基よりなり、そのアミノ酸配列も知られている。SEB分子は2つのドメインから構成され、最初のドメインは残基1～120よりなり、2番目のドメインは残基127～239よりなる。また、SEBのN末端部分にはクラスII主要組織適合遺伝子複合体(Major Histocompatibility Complex)；以下、「MHC」と呼称する)分子結合および／またはT細胞抗原受容体(T cell antigen receptor)；以下、「TCR」と呼称する)結合に影響を与える3つの領域(領域1(残基9～23)、領域2(残基41～53)および領域3(残基60～61))が同定されている。

【0005】

SEBは周知のように細菌性スーパー抗原の1種である(非特許文献8)。通常の抗原はMHCと複合体を形成した状態でT細胞上のTCRに認識され、しかもその認識はクラスII MHC分子のハプロタイプに限定される(これを「MHC拘束性」という)。これに対してスーパー抗原は、クラスII MHC分子のハプロタイプに非拘束性に結合し、さらに特定のTCRの β 鎖領域($V\beta$ 鎖)に結合する。その結果、スーパー抗原が結合したT細胞は一時的に活性化され分裂増殖を引き起こし、炎症性のサイトカインを産生する(非特許文献9)。

【0006】

スーパー抗原を新生マウスに静脈内あるいは腹腔内投与すると、これに応答する $V\beta$ TCRをもったT細胞亜集団が除去され、同じスーパー抗原に対して応答しなくなるトレランスの状態になる。一方、成体のマウスに投与した場合、そのスーパー抗原に結合する $V\beta$ TCRを持つT細胞がスーパー抗原の再刺激に対して応答しなくなる状態、すなわち、アナジーが誘導されトレランスの状態になる。このようなスーパー抗原の特徴は通常の抗原認識とは異なっている。特定の $V\beta$ TCRを持つT細胞にトレランスを誘導するという性質は、ある種の免疫異常性疾患、特にI型アレルギー性疾患や自己免疫疾患の予防もしくは治療に応用できる可能性を示唆している。事実、疾患モデルマウスの系を用いてSEBを投与することで発症抑制が可能となったという報告がなされている。

【0007】

キム (Kim C.) らは全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus ; 以下、「SLE」と称する) のモデルマウスであるMRL/lprマウスのループス腎炎が、SEBをあらかじめ投与しておくことにより発症を抑制できることを報告した (非特許文献10)。またロット (Rott O.) らは実験的アレルギー性脳脊髄膜炎 (Experimental Allergic Encepharomyelitis ; 以下、「EAE」と称する) の系で前もってSEBを投与し、SEB応答性のV β 8TCRを持つT細胞をトレランス状態にしておくことで発症が抑制できたことを報告した (非特許文献11)。これらの結果は、SEBをワクチンのように用いることで特定の自己免疫疾患の発症を予防できる可能性を示唆するものである。

【0008】

しかしながらこれらの実験ではSEBの投与方法は静脈内もしくは腹腔内であり、投与量も1匹当たり100 μ g前後とかなり多い。このような投与量ではマウスに対して無視できない程度の病原性をもたらすことは必至であり、また抗原性や免疫原性も問題となる。特にスーパー抗原の大量投与は、前述のごとくT細胞亜集団や抗原提示細胞の一時的な活性化を引き起こし、炎症性サイトカインの産生亢進を招き、体内に急激な炎症状態を惹起するという問題がある。また桑畑らはヒトの場合、就学年齢以上の児童では血中にはほぼ100%抗SEB抗体を保有し、更に、唾液等での解析から約50%に抗IgA抗体が検出されることを報告している (非特許文献12)。また折口らはリウマチ患者血清中のIgM型抗SEB抗体が有意に高値を示すことを明らかにしている (非特許文献13)。更に西らは、ヒト血清中の抗SEB抗体の主要エピトープがC端側に存在し、この領域に対する抗体はSEBの中和抗体であることを明らかにしている (非特許文献14)。このことはSEBをヒトに投与した場合、抗体によってSEBの生物活性が中和され、体内から排除されることを意味する。そこで西らは遺伝子工学的手法を用いてC端の主要エピトープを欠如した欠損変異体を構築した。しかしながら、このようにして調製したSEB改変体は不溶性にしか発現せず、十分な評価・解析ができなかった。また、薬剤としての安定供給にも対応できなかった。

【0009】

本発明者らは、スーパー抗原の大量投与に関連する問題について、高度に精製したSEBを病原性を与えない投与量で連続的に長期間経口投与することにより、有効にトレランスを誘導する方策（特許文献1）、ならびにSEBの分子改変を行って本来のSEBの有する毒性を軽減しつつも、免疫異常性疾患の予防・治療に効果を発揮するSEB改変体およびそれらの誘導体を構築し、その有用性を証明してきた（特許文献2）。

【0010】**【特許文献1】**

特開平9-110704

【特許文献2】

WO99/40935

【非特許文献1】

山村雄一、岸本忠三、ロバート・A・グッド編、「薬剤による免疫不全」、免疫科学、1984年、9巻、p.285-289

【非特許文献2】

市川陽一ら、「慢性関節リウマチにおけるメトトレキサートおよびサラゾスルファピリジン長期投与例の検討」、リウマチ、1995年、35巻、p.663-670

【非特許文献3】

柏崎禎夫、「慢性関節リウマチに対するオーラノフィンとメトトレキサートによる併用療法の検討」、リウマチ、1996年、36巻、p.528-544

【非特許文献4】

古谷武文ら、「慢性関節リウマチにおける低用量メトトレキサート療法の有害事象」、リウマチ、1996年、36巻、p.746-752

【非特許文献5】

渡辺言夫、「若年性関節リウマチの薬物療法」、リウマチ、1996年、36巻、p.670-675

【非特許文献6】

八倉隆保、「免疫抑制療法・自己免疫疾患の治療」、総合臨床、1981年、30巻、p.3358

【非特許文献7】

都外川新ら、「慢性関節リウマチにおけるメトトレキサート療法の検討ー有効性のより高い投与法を求めてー」、リウマチ、1997年、37巻、p.681-687

【非特許文献8】

ホワイト (White J.) ら、Cell, 1989, vol. 56, p.27-35

【非特許文献9】

ミクサン (Micusan V. V.) およびチボディーン (Thibodean J.), Seminars in Immunology, 1993, vol. 5, p.3-11

【非特許文献10】

キム (Kim C.) ら、Journal of Experimental Medicine, 1991, vol. 174, p.1131

【非特許文献11】

ロット (Rott O.) ら、International and National Immunology, 1991, vol. 4, p.347

【非特許文献12】

桑畑 (M. Kuwahata) ら、Acta Paediatrica Japonica, 1996, 38, p.1-7

【非特許文献13】

折口 (Origuchi) ら、Annals of the Rheumatic Disease 1995, 54, p.713-720

【非特許文献14】

西 (Jun-Ichiro Nishi) ら、The journal of Immunology, 1997, 158, p.247-254

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

上記のようにSEBを天然のままでヒトに投与した場合、生体に存在する抗S

EB抗体によってSEBの生物活性が中和され、最終的には体内から排除されてSEBによる所望の効果を期待できないという問題がある。そのため、遺伝子工学的手法を用いてSEBのC端の主要エピトープを欠如した欠損変異体も構築されているが、このようにして調製したSEB改変体は不溶性にしか発現せず、それゆえ十分な評価・解析ができておらず、薬剤としての安定供給にも対応できなかった。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明らは、上記のSEBの抗原性に関連する問題を回避するため、進化分子工学的手法（試験管内生物進化）を用いて鋭意研究したところ、天然型のSEBあるいは既知のSEB改変体にアミノ酸置換を導入し、これら改変体の中からスクリーニングすることによって、抗SEB中和抗体との結合性が減弱し、かつ大腸菌で可溶性に発現可能で水溶液中における安定性を保持し、さらに天然のSEBと同等の免疫異常性疾患の改善作用を保持したSEB改変体を調製することができた。

【0013】

本願発明は、黄色ブドウ球菌腸管内毒素B（SEB）に対する中和抗体（抗SEB抗体）との反応性を低減させたSEB改変体を提供する。

本願発明のSEB改変体は、SEBのアミノ酸配列に任意のアミノ酸置換を導入することにより抗SEB抗体との反応性を低減させたものである。かかるアミノ酸置換の導入は、とりわけSEBのアミノ酸配列中の抗SEB抗体エピトープ認識部位で行うのが好ましい。

【0014】

SEBのアミノ酸配列中のアミノ酸置換部位として本願発明において特に好ましいのは、SEBのアミノ酸配列（配列番号1）中の226位のLysから229位のLysまでの領域である。

本願発明に従って抗SEB抗体との反応性を低減させたSEB改変体の具体例としては、SEBのアミノ酸配列中の226位から229位までのアミノ酸配列が以下のものが挙げられる：

- (1) LeuPheAlaAla (配列番号2) ;
- (2) AlaThrThrGln (配列番号3) ;
- (3) LysArgIleIle (配列番号4) 。

本願発明によるSEB改変体はまた、上記アミノ酸置換とともにSEBのアミノ酸配列中の23位のAsnがTyrで置換されているものをも包含する。

【0015】

本願発明はさらに、本願発明に従って得られるSEB改変体を主成分として含有し、SEBに対する免疫学的応答性を低下させ、T細胞活性化の抑制作用を有するものであることを特徴とする、免疫異常性疾患の予防・治療用剤をも提供する。免疫異常性疾患としては、たとえば、関節リウマチ、アレルギー性疾患、およびこれらに類似の疾患が挙げられる。

【0016】

本願発明によるSEB改変体を調製するに際して採用した「進化分子工学的手法」とは、自然界における生物進化（自然淘汰）の過程（あるタンパク質中の1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換される確率は、およそ1回/1000万年であるといわれている）を試験管内で人為的に急加速させて有用なタンパク質等をデザインしようとするものであり、自然界では何万年とかかる進化（新機能獲得、機能向上等）を数ヶ月で行わせることが可能である。

【0017】

本願発明では、抗SEB中和抗体との結合性の低減したSEB改変体を調製するため、抗SEB中和抗体によって認識されるSEB中のエピトープ部位においてアミノ酸置換をランダムに導入し、得られた改変体の中から抗SEB中和抗体との結合性の低減した改変体をスクリーニングした。上記のように、SEBの主要エピトープはC末端（225～234位）に存在することがわかっているので、本願発明ではこのうち226～229位の4アミノ酸残基でのアミノ酸置換を試みた。すなわち、SEBのアミノ酸配列中の226～229位の4アミノ酸残基を天然の20種のアミノ酸で任意に置換した改変体を作製して試験管内で淘汰をさせる母集団とし、その中から抗SEB中和抗体との結合性の低減したSEB改変体をスクリーニングし、さらに大腸菌で可溶性に発現可能で水溶液中におけ

る安定性を保持していること、および天然の S E B と同等の免疫異常性疾患の改善作用を保持していることも確認した。

【0018】

具体的には、本願発明の S E B 改変体の構築はファージディスプレイライブラリー法を用いて以下のようにして行った。

(1) 野生型 S E B のファージディスプレイライブラリーの構築と S E B の抗原性の確認

まず、野生型 S E B を提示した M13 ファージを構築する。発現ベクター、たとえば p T r c 9 9 A (Amersham-Pharmacia社) に組み込まれた野生型 S E B 発現プラスミドを鋳型として、5' - プライマーには S f i I 認識配列を 3' - プライマーには N o t I 認識配列を付加したプライマーを用いて P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) で増幅する。増幅産物を制限酵素 S f i I - N o t I で消化し、プラスミドに組み込み、大腸菌を該プラスミドで形質転換後、ヘルパーファージを感染させ、野生型 S E B をファージ g 3 蛋白との融合蛋白 (S E B - g 3 融合蛋白) として提示したファージ粒子を発現させる。発現の確認は抗 S E B ウサギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットで確認することができる。

次に S E B を提示するファージを段階希釈して抗 S E B 中和モノクローナル抗体、ヒト血漿由来抗 S E B 抗体、および抗 E t a g 抗体との反応性を E L I S A 法で測定し、S E B がファージ上で抗原性を保持して提示されているかを調べればよい。

【0019】

(2) ランダム変異ファージディスプレイライブラリーの構築

S E B または既知の S E B 改変体の C 端の 226 ~ 231 位にランダムな変異を導入したランダム変異ファージディスプレイライブラリーを構築する。S E B または既知の S E B 改変体を発現ベクターに組み込んだプラスミドを鋳型として P C R 法により 226 ~ 231 位にランダムな変異を導入する。既知の S E B 改変体としては、たとえば、S E B の 23 位のアスパラギン残基をチロシン残基に置き換えた変異体である N23Y [W O 9 9 / 4 0 9 3 5 (P C T / J P 9 9 / 0 0 6 3 8)] を用いることができる。

【0020】

変異導入は、たとえば以下のようにして行う。5' - プライマーには S f i I 認識配列（完全長の S E B の N 末端に相当する領域に対応）を付加し、3' - プライマーには N o t I 認識配列を付加するとともに、226～229 位に相当する領域の各アミノ酸に対応したコドンに N N K（N は A、C、G、T のいずれか、K は G または T の塩基を表す）を 4 回繰り返して組み込んだプライマーを用いて 226～229 位に 20 種のアミノ酸が任意に発現するようにした S E B ランダム遺伝子を作製する。S E B ランダム遺伝子を S f i I / N o t I で処理後、プラスミドに組み込み、大腸菌を該プラスミドで形質転換して変異体のライブラリーを構築する。

この形質転換体ライブラリーにヘルパーファージを感染させ、S E B ランダムをファージ g 3 蛋白との融合蛋白として提示したファージ粒子を発現させる。

【0021】

(3) S E B 中和抗体低反応性 S E B 変異体のスクリーニング

抗 S E B 中和モノクローナル抗体に対する反応性、および E t a g 発現効率を指標にして、上記ライブラリーを用いてスクリーニングする。抗 S E B 中和モノクローナル抗体としては、中和活性を有することが確認されているものとして、たとえば S A 5 8 - 2（化学及血清療法研究所により作製）を用いることができる。具体的には、第一ステップとして、抗 E t a g 抗体を固相化したプレートにランダム変異ファージディスプレイライブラリーを反応させて、S E B 変異体融合蛋白（g 3 - E t a g - S E B 変異体）を可溶性に発現しているファージを選択する。第二ステップとして、抗 S E B 中和モノクローナル抗体を固相化したプレートに対して、第一ステップで選択したファージを反応させ、抗体と反応できないファージを回収する。得られたクローンを分離し、変異を導入したエピトープ部位の配列解析、g 3 融合蛋白の発現、発現部所、ヒト抗 S E B 抗体との反応性を解析する。

【0022】

(4) 抗 S E B 中和抗体低反応性 S E B 変異体の選択・評価

上記 (3) で得られたクローンをさらに可溶性発現、発現量、抗 S E B 抗体と

の反応性を指標に解析を続け、幾つかのクローンまで絞り込みを行い、これらのクローンについて、抗SEBモノクローナル抗体、アフィニティー精製ヒト抗SEB抗体との反応性をサンドイッチELISAで評価する。

最後に、反応性の低下したクローンについて改変したエピトープ部位のアミノ酸配列の決定を行う。

【0023】

【実施例】

以下に、実施例に従って本願発明を詳説するが、本願発明はこれら実施例に何等限定されるものではない。

実施例1

抗SEB抗体を用いたSEBによるT細胞活性化の抑制

SEBに対して特異性を有する中和モノクローナル抗体SA58-2（化学及血清療法研究所により作製）、および日本脳炎ウイルスに対して特異性を有するJF2抗体（化学及血清療法研究所により作製）を用いて、SA58-2抗体のSEB中和能の評価を行った。

健常人の末梢血単核球を 1×10^5 /ウエルとなるように96ウエルプレートに播種し、SEB（トキシンテクノロジー社製）を 1 ng/mL の濃度で添加し、同時にSA58-2抗体およびJF2抗体を 0.05 、 0.5 、 5 、 50 ng/mL 加えて3日間刺激し、ハーベスト16時間前にトリチウムチミジン（ $0.5 \mu\text{Ci}$ ）を取り込ませて増殖誘導活性を調べた。

その結果、SEBによる増殖刺激活性はJF2抗体を 50 ng/mL 添加しても抑制は認められなかったが、SA58-2抗体を添加した系では、 5 ng/mL 以上添加した場合、80%以上の抑制効果が認められた（図1）。従って、SA58-2抗体はSEBのリンパ球活性化能を十分に抑制できる中和抗体であることが確認できた。

【0024】

実施例2

SEB改変体の抗SEB抗体との反応性

(1) 野生型SEBのファージディスプレイライブラリーの構築とSEBの抗原

性の確認

進化分子工学的アプローチを用いて抗SEB抗体との結合性を減弱させたSEB改変体の構築は以下のように進めた。まず、野生型SEBを提示したM13ファージを構築した。発現ベクターpTrc99A (Amersham-Pharmacia社) に組み込まれた野生型SEB発現プラスミド (pTrc99A/SEB) を鋳型として、5' -プライマーにはSfiI認識配列を3' -プライマーにはNotI認識配列を付加したプライマーを用いてPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) で増幅した。増幅産物を制限酵素SfiI-NotIで消化し、pCANTAB5E (Pharmacia社) に組み込んだ。このプラスミドを「pCAN/SEB」と命名した。大腸菌TG1をpCAN/SEBで形質転換後、ヘルパーファージを感染させ、野生型SEBをファージg3蛋白との融合蛋白 (SEB-g3融合蛋白) として提示したファージ粒子を発現させた。発現の確認は抗SEBウサギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットで確認した。

【0025】

次にSEBを提示するファージを段階希釈して抗SEB中和モノクローナル抗体SA58-2 (化学及血清療法研究所により作製)、ヒト血漿由来抗SEB抗体、抗EtAg抗体 (Amersham-Pharmacia社) との反応性をELISA法で測定し、SEBがファージ上で抗原性を保持して提示されているか調べた。SEB発現ファージを 1×10^{10} から10倍段階希釈して96ウェルプレートに添加し、抗SEB抗体、あるいは抗EtAg抗体と反応させ、HRP標識二次抗体で発色させて吸光度を測定した。その結果、SEBはファージ上で天然な状態と同様の抗原性を保持して発現、提示されていることが確認された。

【0026】

(2) ランダム変異ファージディスプレイライブラリーの構築

SEB改変体の一つであるN23Y [SEBの23位のアスパラギン残基をチロシン残基に置き換えた変異体: WO99/40935 (PCT/JP99/00638)] をpTrc99Aに組み込んだプラスミドpTrc99A/N23Yを鋳型にして、PCR法にてC端の226~229位にランダムな変異を導入した。変異導入は以下のようにして行った。

【0027】

5' -プライマーにはS f i I 認識配列（完全長のS E BのN末端に相当する領域に対応）を付加し、3' -プライマーにはN o t I 認識配列を付加するとともに、226～229位に相当する領域の各アミノ酸に対応したコドンにNNK（NはA、C、GまたはTのいずれか、KはGまたはTの塩基を表す）を4回繰り返して組み込んだプライマーを用いて226～229位に20種のアミノ酸が任意に発現するようにしたN23Yランダム遺伝子を作製した。N23Yランダム遺伝子をS f i I / N o t I で処理後、p C A N T A B 5 E に組み込んだ。このプラスミドを「p C A N / N 2 3 Yランダム」と命名した。大腸菌T G 1 を p C A N / N 2 3 Yランダムで形質転換した結果、 1.88×10^5 種の変異体からなるライブラリーを構築できた。

【0028】

この形質転換体ライブラリーにヘルパーファージを感染させ、N23Yランダムをファージg3蛋白との融合蛋白として提示したファージ粒子を発現させた。E t a g 抗体およびS A 5 8 - 2 抗体、アフィニティー精製ヒト抗S E B 抗体との反応をE L I S A で解析した結果、N23Yランダムのファージ上への呈示率は野生型の1/20にすぎないが、S A 5 8 - 2 抗体、アフィニティー精製ヒト抗S E B 抗体との反応性は1/200以下に低下していることを確認した。従って、ライブラリーを構成するN23ランダムの各抗体への反応性は野生型に比べ平均約1/10に低下していると考えられた。このことはこのライブラリー中にこれらのS E B 抗体との反応性が低下した配列が十分に含まれていることを示していると考えられた。

【0029】

(3) S E B 中和抗体低反応性S E B 改変体のスクリーニング

中和活性を有することが確認されている抗S E B 中和モノクローナル抗体S A 5 8 - 2 に対する反応性、およびE t a g 発現効率を指標にして、上述のライブラリーを用いてスクリーニングを3回実施した。すなわち、第一ステップとして、抗E t a g 抗体を固相化したプレートにランダム変異ファージディスプレイライブラリーを反応させて、S E B 改変体融合蛋白（g3-E t a g - S E B 改変

体)を可溶性に発現しているファージを選択した。第二ステップとして、抗SEB中和モノクローナル抗体SA58-2を固相化したプレートに対して、第一ステップで選択したファージを反応させ、抗体と反応できないファージを回収した。この中から任意に48クローンを分離し、変異を導入したエピトープ部位の配列解析、g3融合蛋白の発現、発現部所、ヒト抗SEB抗体との反応性を解析した。

その結果、48クローン中30クローンがg3との融合蛋白として発現しており、その中で21クローンが培養上清中に発現可能であった。更に21クローン中10クローンはヒト抗SEB抗体と明らかに反応したが、残る11クローンの反応性は顕著に低下していた。

【0030】

(4) 抗SEB中和抗体低反応性SEB改変体の選択・評価

可溶性発現、発現量、抗SEB抗体との反応性を指標に更に解析を続けた結果、4-C1、4-C3、42-C2、42-C3、47-C3、47-C7、48-C1、48-C4の8クローンに絞り込まれた。これらのクローンについて、SA58-2抗体、アフィニティー精製ヒト抗SEB抗体との反応性をサンドイッチELISAで評価した。

【0031】

発現蛋白量を併せて、両抗体に対する反応性を評価した結果、全てのクローンで反応性が低下していた(図2)。特に中和抗体であるSA58-2に対する反応性は、鑄型に用いたN23Yと比べてクローン42-C2や48-C1、48-C4で約1/30~1/50、47-C7で約1/8、4-C1で約1/2に低下していた(表1)。精製ヒト抗SEB抗体に対する反応性では、同じく42-C2や48-C1、48-C4、また47-C7で約1/8程度、4-C1で約1/2~1/4に低下していた(表1)。なお、これら抗SEB抗体との反応性を調べたクローンについては、エピトープ領域中のアミノ酸置換部位の配列も決定し、表1に示した。

【0032】

以上の反応性を総合的に解析評価して、以下の実験には42-C2、47-C

7、および4-C1を用いることとした。N23Yを鑄型としたこれらのSEB改変体を、以下、「エピトープ改変体」と総称する。

表1: エピトープ改変体の抗SEB抗体との反応性低下

クローンNo.	エピトープ領域配列	* 1	* 2
N23Y	SKDVKIEVYL (配列番号5)	1	1
42-C2	SLFAAIEVYL (配列番号6)	1/50	1/8
47-C7	SATTQIEVYL (配列番号7)	1/8	1/8
4-C1	SKRIIEVYL (配列番号8)	1/2	1/2~1/4
48-C4	SPQPDIEVYL (配列番号9)	1/30	1/8

* 1: 抗SEBモノクローナル抗体との反応性

* 2: ヒト抗SEB抗体との反応性

【0033】

実施例3

エピトープ改変体の末梢血単核球に対する生物学的解析

(1) エピトープ改変体の増殖ならびに幼若化誘導活性の評価

健常人の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; 以下、「PBMC」と称することがある) を 1×10^5 / ウェルとなるように96ウェルプレートに播種し、SEB、N23Y、SEBエピトープ改変体を0.01、1、100、1000 ng/mLの濃度で3日間刺激し、ハーベスト16時間前にトリチウム-チミジン ($0.5 \mu\text{Ci}$) を取り込ませて増殖誘導活性を調べた。また、上記PBMCを各々同濃度のSEB改変体存在下で中期間 (6日間) 培養し、T細胞の幼若化の程度をフローサイトメトリー (以下、「FACS」と称することもある) のFSC/SSC解析により調べた。

【0034】

その結果、SEBは 0.01 ng/mL 以上でPBMCに対し濃度依存的に強い増殖誘導活性を示した。代表例を図3に示す。N23YはSEBより増殖誘導活性はかなり弱く、 100 ng/mL 以上でトリチウムチミジンの取り込みが検出されはじめ、 1000 ng/mL でもSEBの $1/10$ 程度のカウントであった。エピトープ改変体は更に増殖誘導能が低下していた(図3)。また、幼若化誘導活性ではN23Yは 1 ng/mL 以上で $10-30\%$ の細胞に有意な幼若化を誘導したが、42-C2および47-C7の誘導活性はN23Yの約 $1/10$ 程度であった。4-C1はN23Yとほぼ同等であった(図4)。これらの成績から、エピトープ改変体はエピトープに変異を導入しても、インビトロでヒトPBMCに対する増殖誘導能や幼若化誘導能において、N23Yとほぼ同等の生物活性を有していることが明らかとなった。

【0035】

(2) エピトープ改変体のサイトカイン誘導活性の評価

健常人のPBMCを $1 \times 10^6 / \text{mL}$ で24ウェルプレートに播種し、SEB、N23Y、およびエピトープ改変体の 0.01 、 1 、 100 、 1000 ng/mL で2日間刺激後、上清を回収した。この培養上清の種々のサイトカイン(TNF- α 、IL- 1β 、IL-6、IL-8、IL-12、IFN- γ 、IL-1ra、IL-4、IL-10、GM-CSF)産生をELISAキット(Cyto Sets、CytoFix、旭テクノグラス社)を用いて測定した。

【0036】

その結果、エピトープ改変体はN23Yと同様、SEBに比べサイトカイン産生能は低く、サイトカイン誘導パターンはN23Yと同様の傾向を示した。すなわち、抑制性サイトカインIL-1ra、IL-10、IL-4産生は相対的に有意に高く、炎症性サイトカインIL- 1β 、IL-6、TNF- α 、IL-12、GM-CSF、IFN- γ の誘導は低かった。SEB 100 ng/mL 刺激時のサイトカイン誘導活性を 100% としたときのエピトープ改変体(100 ng/mL)の相対活性を図5に示す。エピトープ改変体はインビトロでヒトPBMCに対するサイトカイン誘導能においてN23Yと同等の生物学的活性を有し

ていた。

また、図5に示す結果から明らかなように、SEBと比較してN23Yやエプトーブ改変体ではIFN- γ の誘導が顕著に抑制され、それに対して抑制性サイトカインIL-4、IL-10の産生は相対的に高いことから、SEB改変体はT細胞ポピュレーションをTh1からTh2へシフトさせる活性を有していると考えられた。

【0037】

実施例4

(1) エプトーブ改変体のマウス関節炎モデルでの評価

マウスのコラーゲン誘導性関節炎(CIA)モデルでN23Yおよびエプトーブ改変体の薬効を評価した。7週齢のDBA/1J雄マウスの尾根部にフロイントのコンプリートアジュバント(FCA)を用いて、ウシII型コラーゲンをマウス当たり100 μ gで感作した。3週後に再度同抗原で追加感作して関節炎を誘導した。追加感作1週後に各マウスの四肢を観察し、関節炎の発症程度をスコア化した。スコア化は以下のように行った。各四肢について、未発症:0点、指が1本腫脹:1点、指が2~4本腫脹あるいは肢の甲が腫脹:2点、全ての指が腫脹あるいは激しい腫脹:3点。四肢の合計点数を算出し(最高12点)、当該マウスの関節炎スコアとした。関節炎のスコアが1~4点の軽度のマウスを選別して群を構成し、薬剤を経口投与した。薬剤は10 μ g/マウスでゾンデを使って4週間連日投与した。薬剤投与開始から1週間に2度スコアを付け、関節炎の程度を観察した。投与終了後に四肢の関節をソフトX線で撮影して、骨びらんの程度をスコア化して骨破壊に対する作用を評価した。

その結果、生理食塩水投与のコントロール群に比べて4-C1および47-C7の各エプトーブ改変体は関節炎症状を有意に抑制した。42-C2では抑制は認められなかった(図6)。また、47-C7および4-C1では骨破壊の抑制効果も観察された(図7)。

【0038】

(2) エプトーブ改変体投与による抗SEB抗体の惹起

試験終了後に全採血し、血中の抗SEB抗体価をELISA法にて測定した。

その結果、47-C7投与群は薬剤無投与群、コントロールの生理食塩水投与群と同程度の値を示し、免疫原性が低減されていることが明らかとなった(図8(A))。また、47-C7改変体は、この蛋白自身に対する抗体誘導も低く、エピトープを改変した配列が新たな抗原エピトープとなっている可能性は低いと思われた(図8(B))。

【0039】

【発明の効果】

以上得られた結果より、本願発明のSEBエピトープ改変体は、SEBに対する中和抗体との反応性が低減し、且つN23Yと同等のCIA症状改善効果があることが示された。更にこれらのエピトープ改変体は可溶性に分泌発現が可能であり、関節リウマチ、アレルギー性疾患等の免疫異常疾患の有効な予防・治療剤としての使用が期待される。

【0040】

SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE
KOWA COMPANY, LTD.

<120> SEB VARIANT AND MEDICAMENT FOR PREVENTING AND TREATING IMMUNOPATHIES CONTAINING THE SAME

<130> 187409

<160> 9

<210> 1

<211> 239

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

Glu Ser Gln Pro Asp Pro Lys Pro Asp Glu Leu His Lys Ser Ser Lys

1

5

10

15

Phe Thr Gly Leu Met Glu Asn Met Lys Val Leu Tyr Asp Asp Asn His
 20 25 30
 Val Ser Ala Ile Asn Val Lys Ser Ile Asp Gln Phe Leu Tyr Phe Asp
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ser Ile Lys Asp Thr Lys Leu Gly Asn Tyr Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Val Glu Phe Lys Asn Lys Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Lys Asp Lys
 65 70 75 80
 Tyr Val Asp Val Phe Gly Ala Asn Tyr Tyr Tyr Gln Cys Tyr Phe Ser
 85 90 95
 Lys Lys Thr Asn Asp Ile Asn Ser His Gln Thr Asp Lys Arg Lys Thr
 100 105 110
 Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr Glu His Asn Ala Asn Gln Leu Asp Lys
 115 120 125
 Tyr Arg Ser Ile Thr Val Arg Val Phe Glu Asp Gly Lys Asn Leu Leu
 130 135 140
 Ser Phe Asp Val Gln Thr Asn Lys Lys Lys Val Thr Ala Gln Glu Leu
 145 150 155 160
 Asp Tyr Leu Thr Arg His Tyr Leu Val Lys Asn Lys Lys Leu Tyr Glu
 165 170 175
 Phe Asn Asn Ser Pro Tyr Glu Thr Gly Tyr Ile Lys Phe Ile Glu Asn
 180 185 190
 Glu Asn Ser Phe Trp Tyr Asp Met Met Pro Ala Pro Gly Asp Lys Phe
 195 200 205
 Asp Gln Ser Lys Tyr Leu Met Met Tyr Asn Asp Asn Lys Met Val Asp
 210 215 220
 Ser Lys Asp Val Lys Ile Glu Val Tyr Leu Thr Thr Lys Lys Lys
 225 230 235

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Modified sequence at residues No. 226 to No. 229 in SEB

<400> 2

Leu Phe Ala Ala

1 4

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Modified sequence at residues No. 226 to No. 229 in SEB

<400> 3

Ala Thr Thr Gln

1 4

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Modified sequence at residues No. 226 to No. 229 in SEB

<400> 4

Lys Arg Ile Ile

1 4

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitope region of N23Y SEB variant

<400> 5

Ser Lys Asp Val Lys Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitope region of 42-C2 SEB variant including modified sequence at residues No. 226 to No. 229

<400> 6

Ser Leu Phe Ala Ala Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitope region of 42-C7 SEB variant including modified sequence at
residues No. 226 to No. 229

<400> 7

Ser Ala Thr Thr Gln Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitope region of 4-C1 SEB variant including modified sequence at
residues No. 226 to No. 229

<400> 8

Ser Lys Arg Ile Ile Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitope region of 48-C4 SEB variant including modified sequence at residues No. 226 to No. 229

<400> 9

Ser Pro Gln Pro Asp Ile Glu Val Tyr Leu

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 抗 S E B 中和モノクローナル抗体 SA58-2 を用いて、S E B によるヒト PBMC 活性化の抑制試験の結果を示した図。

【図 2】 本願発明の S E B エピトープ改変体の、抗 S E B 中和モノクローナル抗体 SA58-2 (A)、あるいはヒト抗 S E B 抗体 (B) との反応性を示す図。

【図 3】 本願発明の S E B エピトープ改変体でヒト PBMC を 3 日間刺激して、細胞の増殖応答をトリチウムチミジンのカウントで測定した図。

【図 4】 本願発明の S E B エピトープ改変体でヒト PBMC を 6 日間刺激して、細胞の幼若化反応をフローサイトメトリーで測定後、幼若化の割合をパーセントで示した図。

【図 5】 本願発明の S E B エピトープ改変体でヒト PBMC を 2 日間刺激し、培養上清中に分泌される各種サイトカインを E L I S A 法で測定した結果の図 (B)、および測定値を野生型 S E B に対する相対値で示した図 (A)。

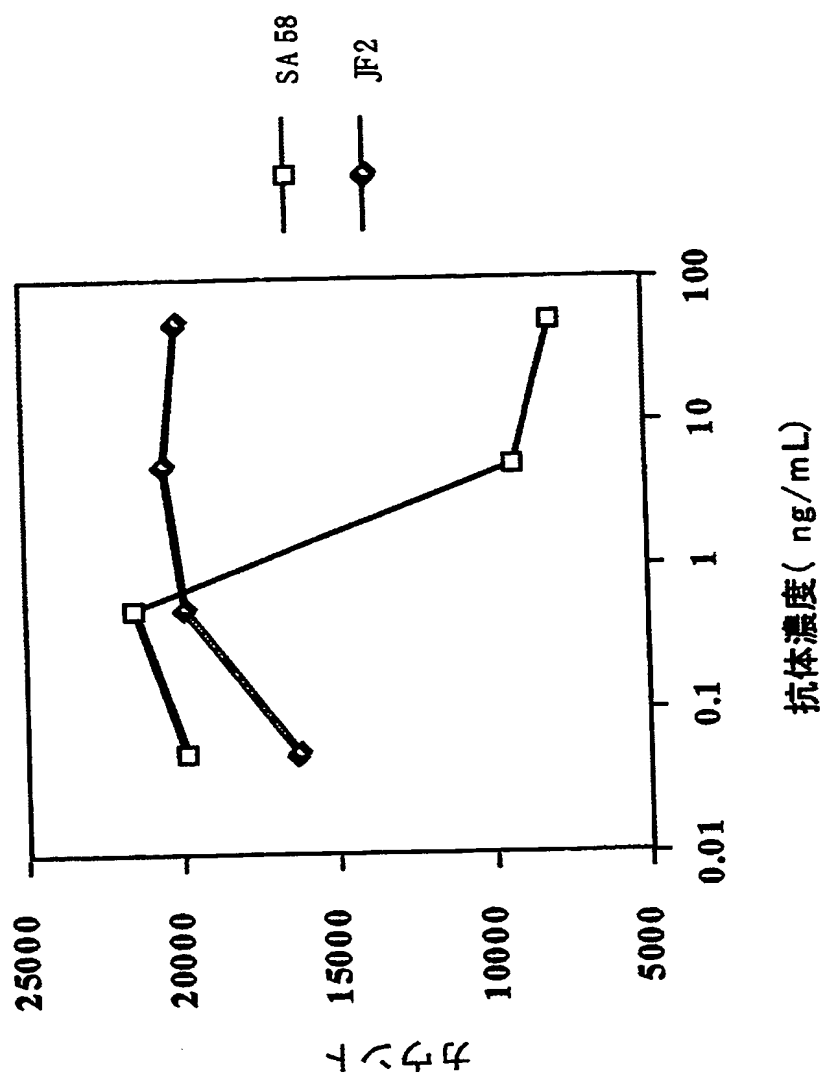
【図 6】 本願発明の S E B エピトープ改変体を、マウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルで四肢の腫脹の抑制を評価した図。

【図 7】 本願発明の S E B エピトープ改変体を、マウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルで骨破壊の抑制を評価した図。

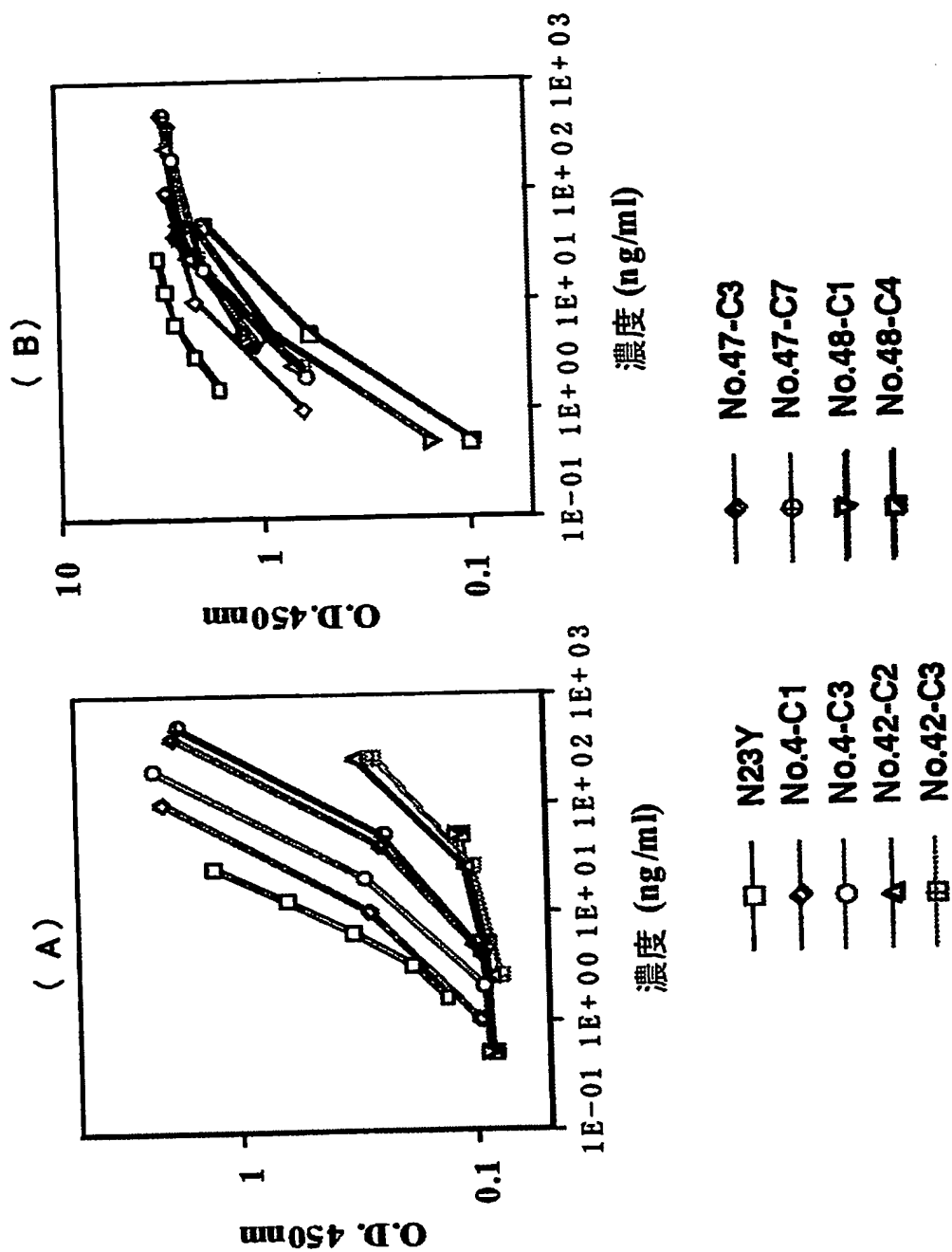
【図 8】 本願発明の S E B エピトープ改変体を経口投与したマウスの血中の抗 S E B 抗体価 (A) および抗 47-C7 抗体価 (B) の測定値 (450 nm の吸光度の値) を示した図。

【書類名】 図面

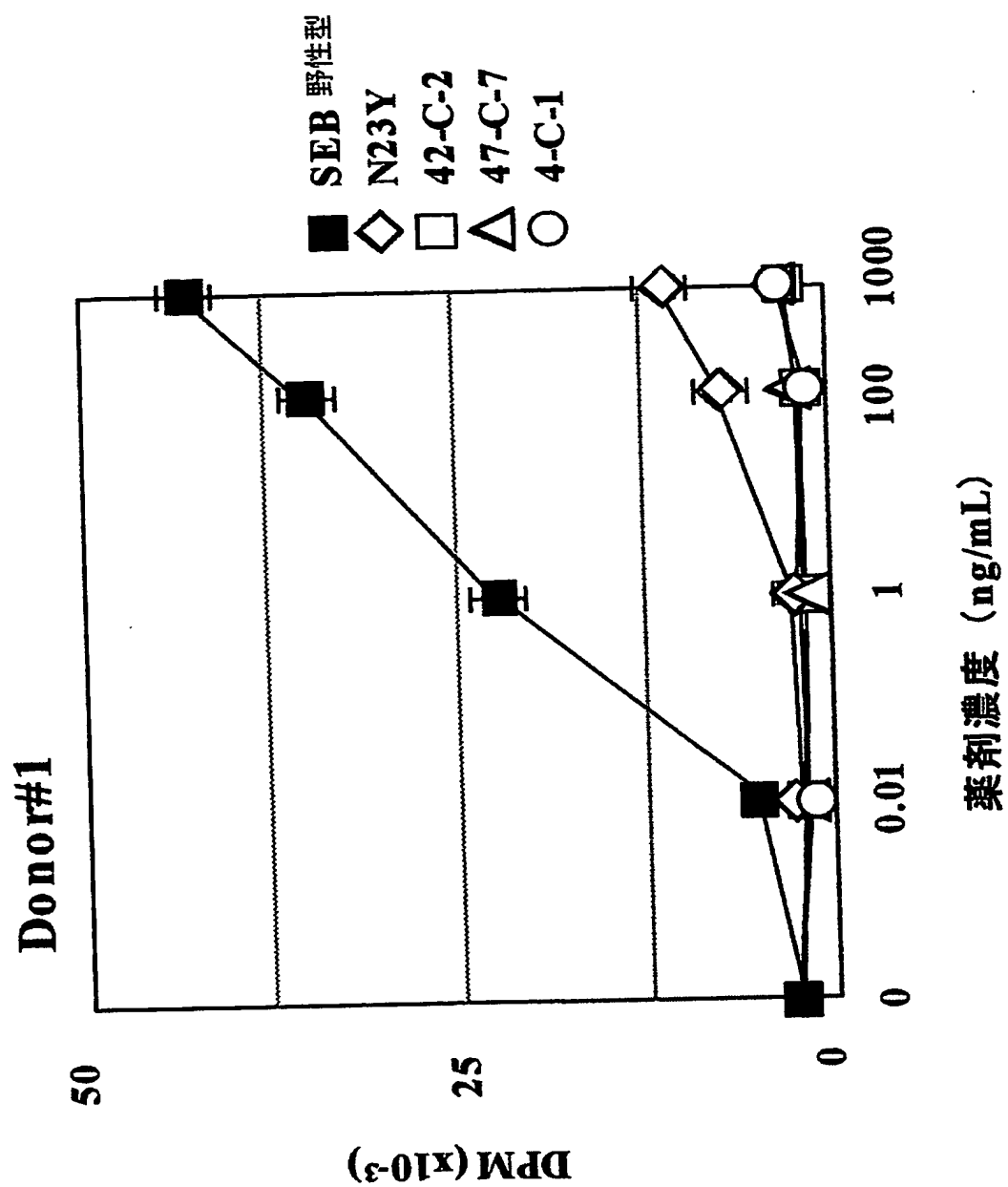
【図 1】



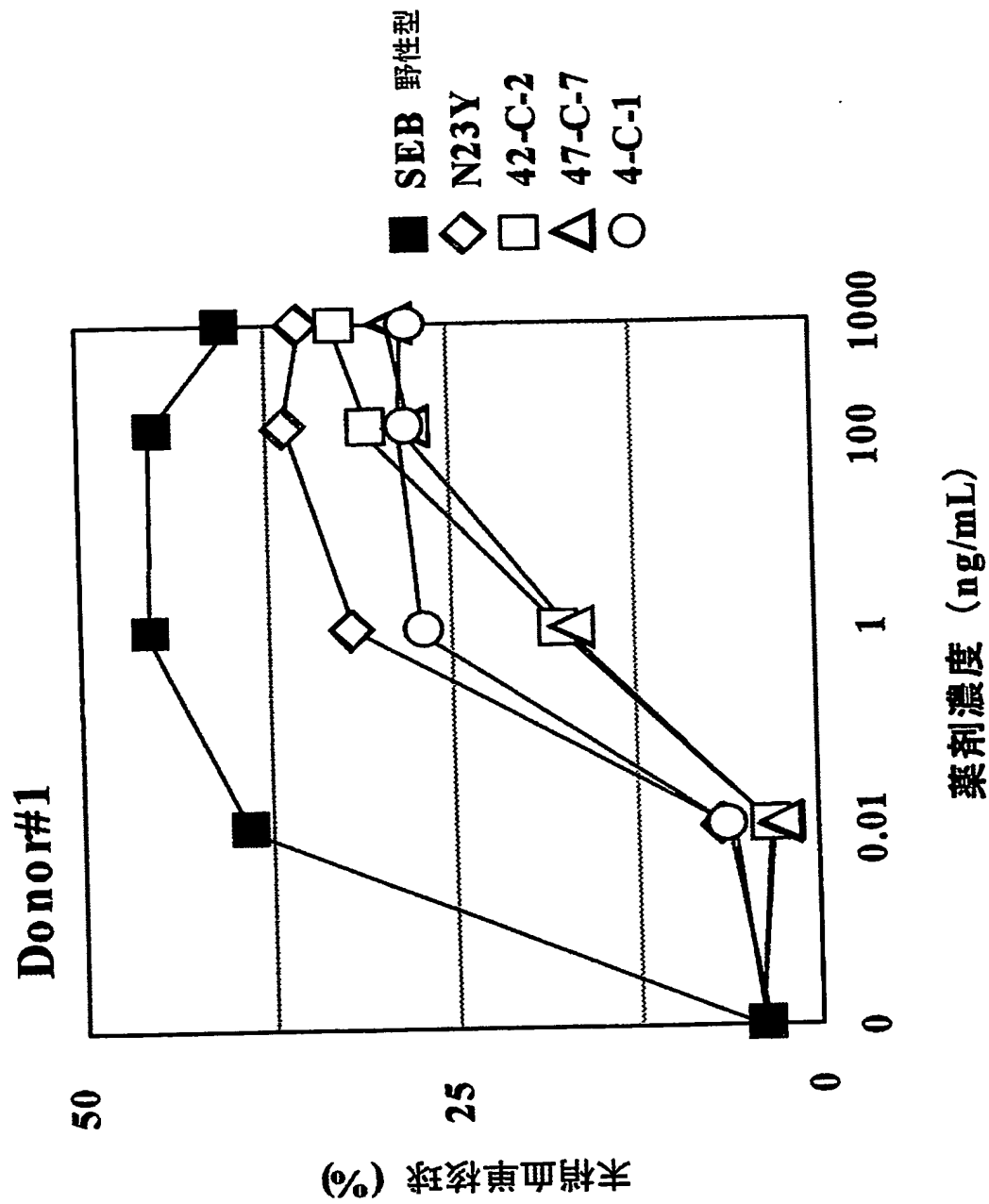
【図2】



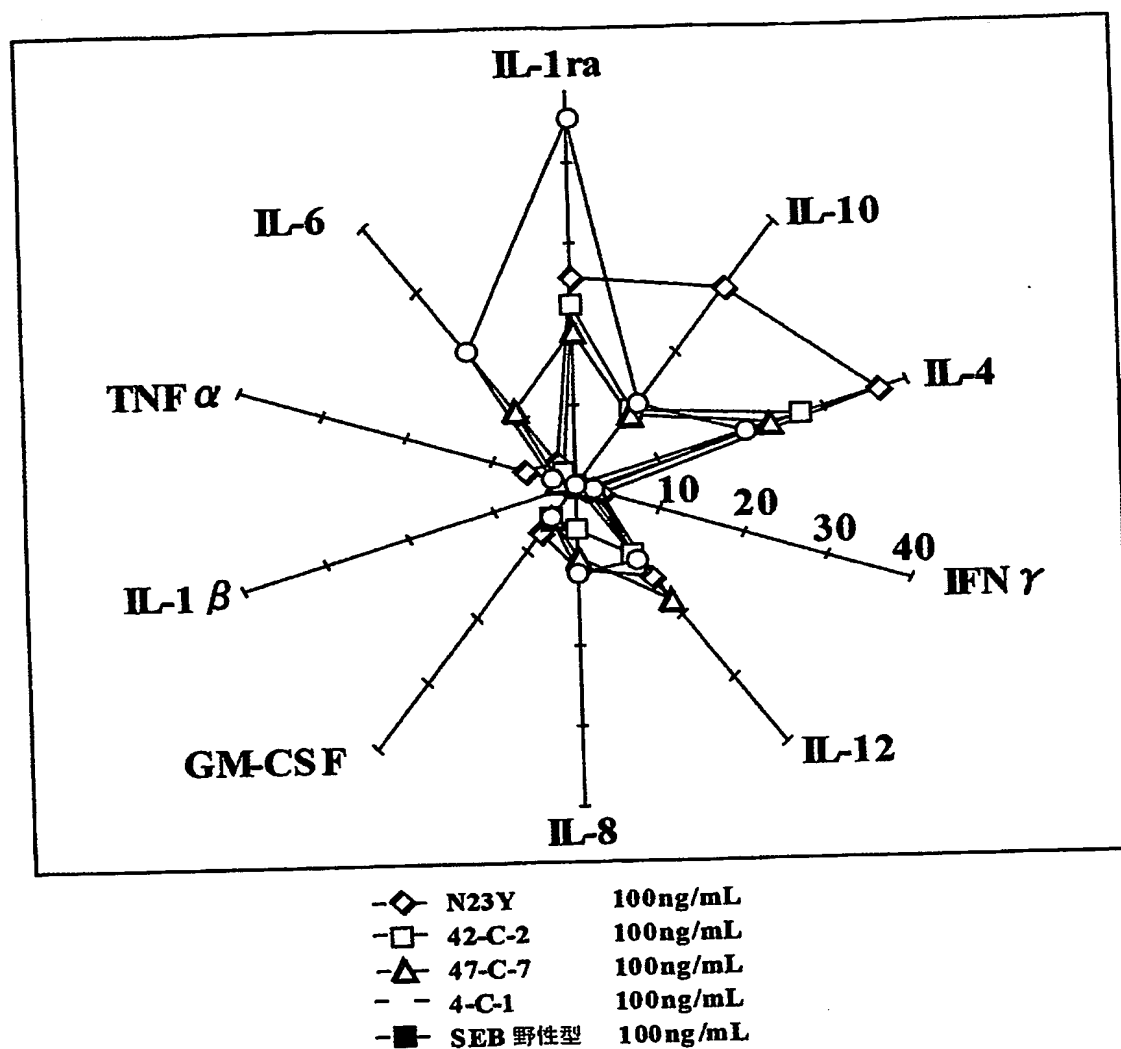
【図3】



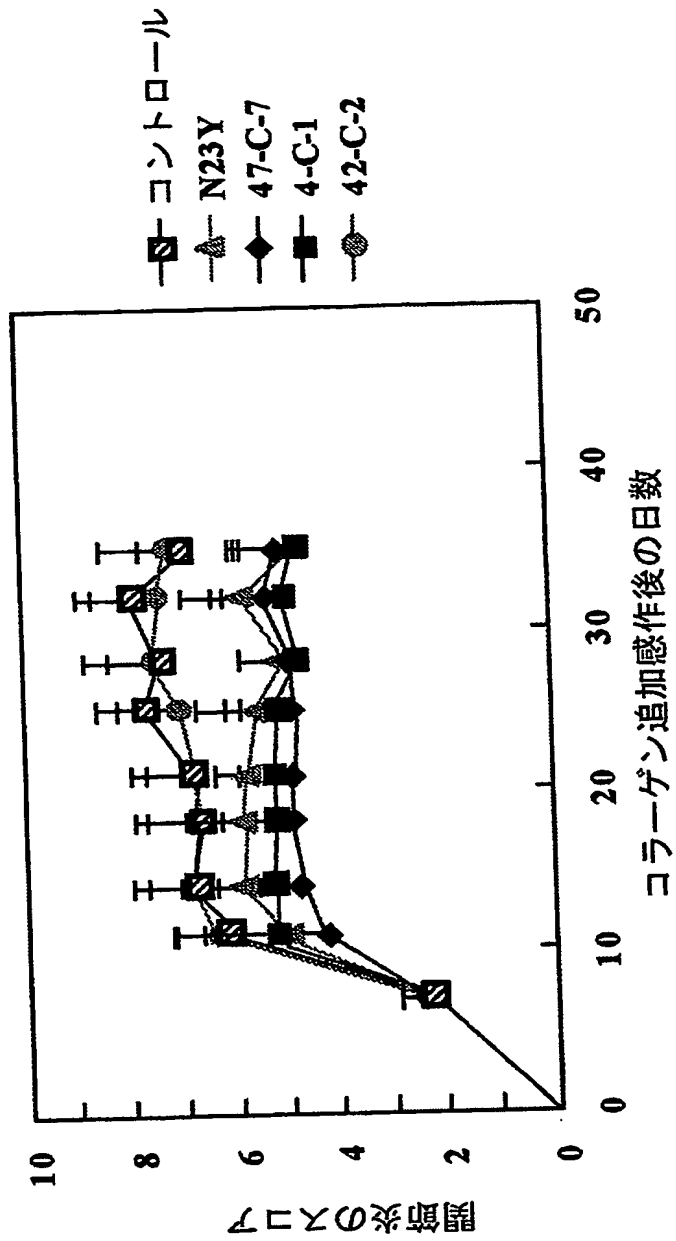
【図4】



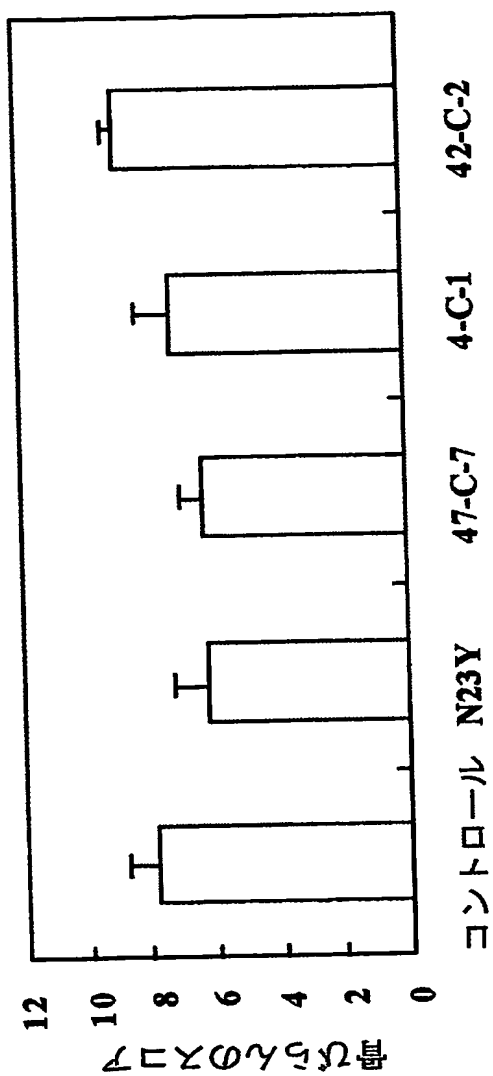
【図5】



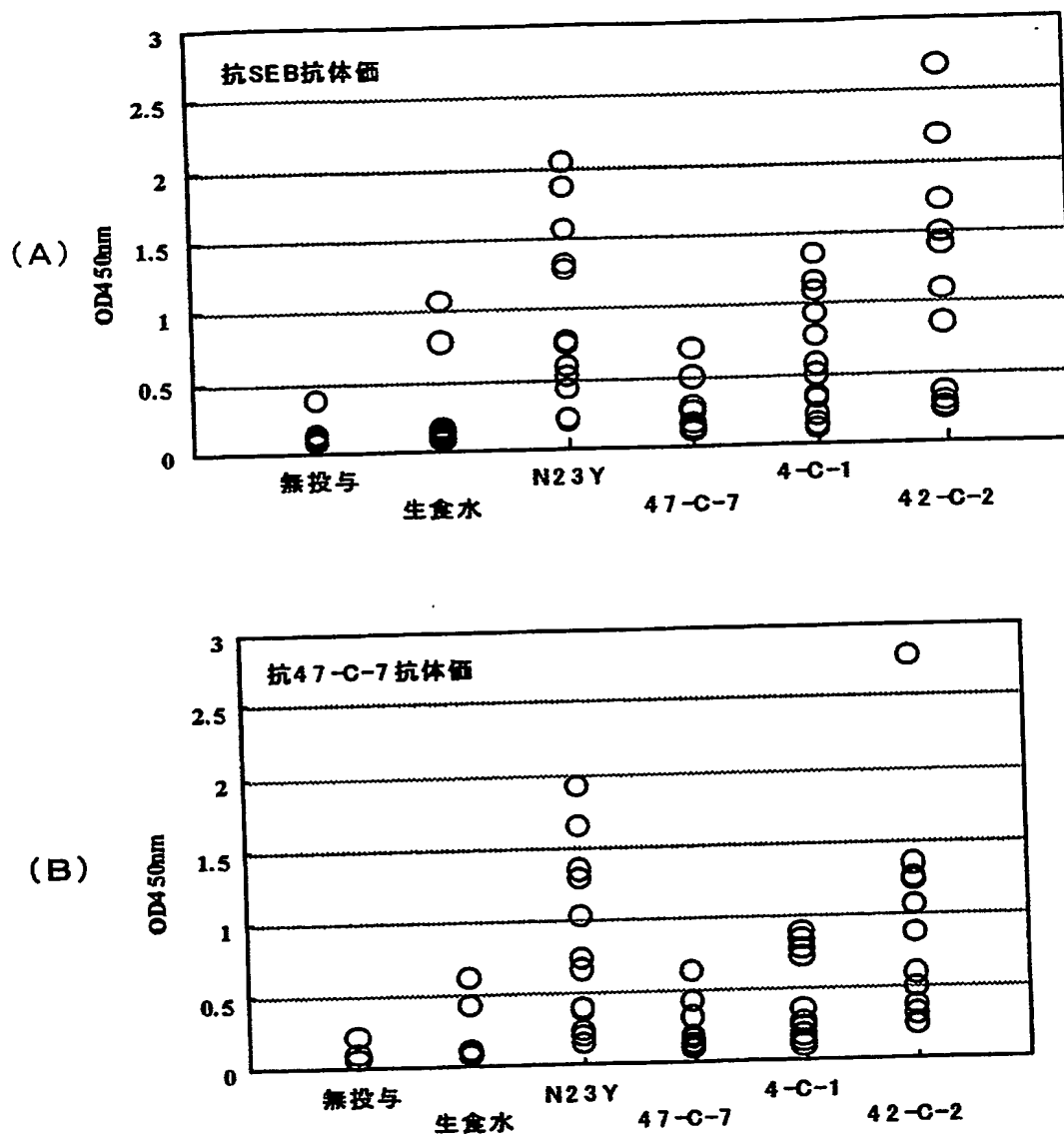
【図6】



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 スーパー抗原の一つとして知られる黄色ブドウ球菌腸管内毒素B (SEB) の中和抗体によって中和されることなく、スーパー抗原として有効に作用しうる新規な免疫異常性疾患の予防・治療用剤を提供する。

【解決手段】 SEBに対する中和抗体(抗SEB抗体)との反応性を低減させたSEB改変体および該改変体を有効成分として含有する免疫異常性疾患の予防・治療用剤。本願発明のSEB改変体は、SEBのアミノ酸配列、とりわけ抗SEB抗体によって認識されるエピトープ部位のアミノ酸配列でアミノ酸置換を行うことにより、進化分子工学的手法により得ることができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-091819
受付番号	50300519619
書類名	特許願
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成 15 年 4 月 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【特許出願人】

【識別番号】	000173555
【住所又は居所】	熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号
【氏名又は名称】	財団法人化学及血清療法研究所

【特許出願人】

【識別番号】	000163006
【住所又は居所】	愛知県名古屋市中区錦 3 丁目 6 番 2 9 号
【氏名又は名称】	興和株式会社

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100062144
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】	100086405
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】	100068526
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	田村 恭生

次頁無

特願 2003-091819

出願人履歴情報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日
[変更理由]

住所
氏名

1996年 3月 4日
住所変更
熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
財団法人化学及血清療法研究所

特願 2003-091819

出願人履歴情報

識別番号

[000163006]

1. 変更年月日
[変更理由]

住所
氏名

1990年 8月20日
新規登録
愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号
興和株式会社